J·TEC

取扱説明書

研究用試薬

ヒト 3 次元培養角膜上皮

LabCyte CORNEA-MODEL

（ラボサイト 角膜モデル）

CORNEA-MODEL

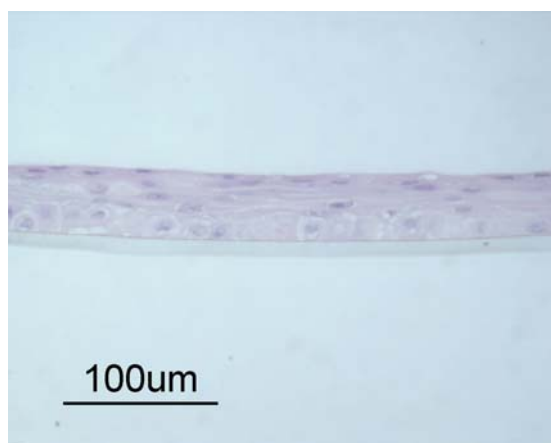
ご使用前に必ずお読みください

目次

このたびは「LabCyte　CORNEA-MODEL 24(ラボサイト　角膜モデル 24)」をお買い上げいただきましてありがとうございます。
ご使用前に本取扱説明書をお読みになり、眼刺激性試験研究など様々な角膜上皮組織に関連する研究にお役立てください。

Ⅰ. LabCyte CORNEA-MODEL （ラボサイト 角膜モデル）の特徴

「LabCyte　CORNEA-MODEL （ラボサイト　角膜モデル）」は、ヒト正常角膜上皮細胞を用いて培養し、重層化させた 3 次元ヒト培養角膜上皮です。形態的にヒト角膜上皮組織に類似した構造をしております。
本製品は、ヒト角膜上皮組織の代替材料として使用していただけます。特に in vitro 眼刺激性試験に使用していただけるよう、本モデルを用いた試験法を開発しております。
その他、様々な角膜上皮関連基礎研究に使用することが可能です。
また、本製品は、当社が開発している医療用角膜培養技術を応用して製造しております。このため、優れた品質安定性を有しており、再現性の高い評価試験結果が得られます。

LabCyte CORNEA-MODEL

ヘマトキシリン・エオジン染色像

Ⅱ. 梱包内容と各製品の名称・説明

下記の製品が入っていますのでご確認ください。

製品名	CORNEA-MODEL 24 角膜モデル
3 次元ヒト培養角膜上皮	3 次元ヒト培養角膜上皮はアルミ包装されています。3 次元ヒト培養角膜上皮は培養カップ上に入っており、培養カップは寒天培地中に固定されています。
	24 ウェルプレートに 24 個入
24 ウェル アッセイ プレート	寒天培地中に固定された 3 次元ヒト培養角膜上皮の入った培養カップを取り出し、この 24 ウェルアッセイプレートに移して使用します。
	1 枚
アッセイ培地	アッセイ培地(30mL) 2 度培地交換が可能な量が入っています。 培地は、冷蔵(2～8℃)で保存してください。使用期限はボトルのラベルに記載されています。

Ⅲ. 取り扱い・注意（製品の受け入れ）

① お受け取り後の確認

本製品をお受け取り後、直ちに開梱し、製品に破損や液漏れがないことを確認してください。万が一不良がございましたら、お手数をおかけいたしますが、下記までご連絡ください。

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング　営業部
TEL：0533-66-2129（直通）、FAX：0533-66-2018

② 保存と使用期限

LabCyte CORNEA-MODEL はアルミ包装状態のまま、常温（15～25℃）で保存してください。アルミ包装のラベルに記載された使用期限内にご使用ください。再現性を良くするために、試験をおこなうまでの保存期間を一定にすることをお勧めいたします。

開封後は、できる限りすべての培養カップを使い切ってください。付属のアッセイ培地中での保存やCO_2インキュベーター（37℃、5-10%CO_2）内での保存は細胞の代謝を促進するため適していません。

なお、アッセイ培地は、冷蔵（2～8℃）で保存してください。使用期限はボトルのラベルに記載されています。

Ⅳ. 使用方法

ここでは、本品を用いた試験・研究の一例をご説明いたします。本製品はヒト角膜上皮組織に類似した構図をしております。お客様の目的に応じて、様々な試験・研究にご利用ください。

Ⅳ-1. 眼刺激性試験

＜試験の準備＞

① **機器**

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）
・ウォーターバス
・CO_2インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）

② **試薬・器具**

・アッセイ培地【付属品・別売品】
・24 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】
・リン酸緩衝液（PBS）
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット類（滅菌済み）
・マイクロチューブ

＜試験方法＞

① **準備**

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

（1） アッセイ培地を 37℃のウォーターバスで温めます。
（2） 24 ウェルアッセイプレートの各ウェルに温めたアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注します。
（3） LabCyte CORNEA-MODEL をアルミ包装袋より取り出します。
（4） プレートのフタを開け、3 次元ヒト培養角膜上皮が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

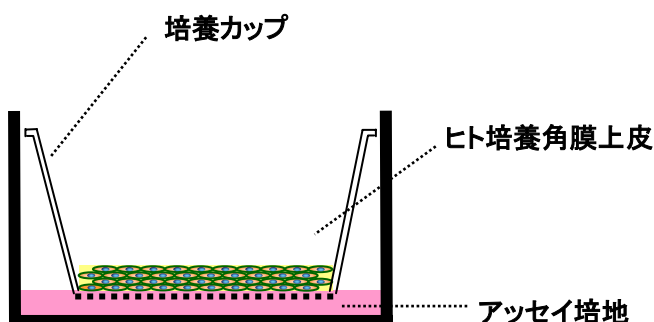
[Point] 培養カップ底面と寒天培地の間に空気を入れるようにすると容易に取り出すことができます。

〔CAUTION〕 培養カップ内の 3 次元ヒト培養角膜上皮表面には触れないように注意してください。培養カップの外側に付着している寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いてください。

(5) LabCyte CORNEA-MODEL をアッセイ培地の入った 24 ウェルアッセイプレートの各ウェルに移します。

培養カップ

ヒト培養角膜上皮

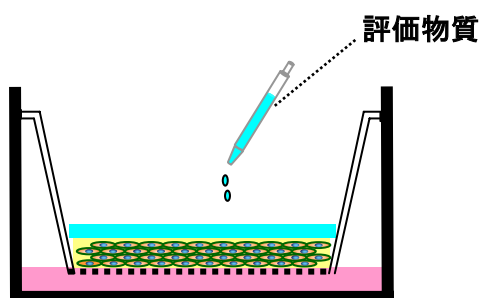
アッセイ培地

培養カップはアッセイプレートのウェル内に静置してください

[CAUTION]
培養カップ表面に気泡が入らないように注意してください。気泡はピンセットで培養カップをゆすったりすると取り除くことができます。

(6) 24 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。
(7) 評価物質の暴露までに、最低 1 時間静置します。

② 評価物質の暴露

操作はすべて、クリーンベンチ(または安全キャビネット)内で無菌的に行ってください。

(1) 24 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。
(2) 評価物質を培養カップの 3 次元ヒト培養角膜上皮表面に必要量添加します。(全面に均一にゆきわたらせてください)。
陰性対照としては、評価物質の溶媒などを用いて、目的に応じて同様の操作を行なってください。

評価物質

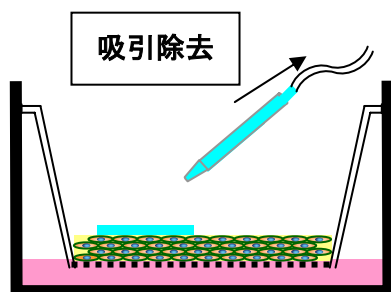
[Point]
評価物質の適用量は、液体の場合、通常 50μL です。最大 0.8mL まで適用することができます。粘性の高い物質や固形物質の場合は、天秤を用いて重量で適用してください。スパーテルなどを用いて、3 次元ヒト培養角膜上皮表面を傷つけないように塗布してください。

(3) 24 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。暴露時間は目的に応じて設定してください。

③ 評価物質の除去

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

(1) 24 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。
(2) 培養カップ内の評価物質を吸引除去します。

吸引除去

〔CAUTION〕
3 次元ヒト培養角膜上皮表面を傷つけないように注意しておこなってくださいさい。

(3) 残存している評価物質を取り除くため、リン酸緩衝液（PBS）で培養カップ内部を 3 回以上洗浄します。

〔CAUTION〕
リン酸緩衝液（PBS）を 3 次元ヒト培養角膜上皮表面に強く吹き付けないでください。評価物質が残存する場合、滅菌綿棒などを用いて、3 次元ヒト培養角膜表面を傷つけないように取り除き、再度洗浄を行ってください。

(4) 必要に応じて、<u>IV-2 LabCyte CORNEA-MODEL の培養</u> に従って、後培養を行ないます。

(5) (1)-(4)の操作終了後、IV-3 MTT 試験、あるいは IV-4 WST-8 試験 に従って LabCyte CORNEA-MODEL の生細胞数を測定し、眼刺激性の指標として生細胞率を算出します。
その他、組織標本の作製や培養液中の炎症性サイトカイン産生量の測定等も行なっていただけます。

Ⅳ-2. LabCyte CORNEA-MODEL の培養

＜試験の準備＞

① 機器

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）

・ウォーターバス

・CO_2 インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）

② 試薬・器具

・アッセイ培地【付属品・別売品】

・24 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】

・リン酸緩衝液（PBS）

・ピンセット（滅菌済み）

・ピペット類（滅菌済み）

＜試験方法＞

① 準備

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

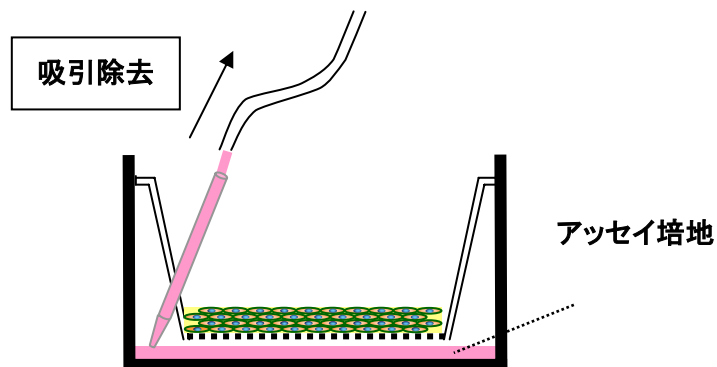
（1） アッセイ培地を 37℃のウォーターバスで温めます。

（1） 培養する LabCyte CORNEA-MODEL を準備します。

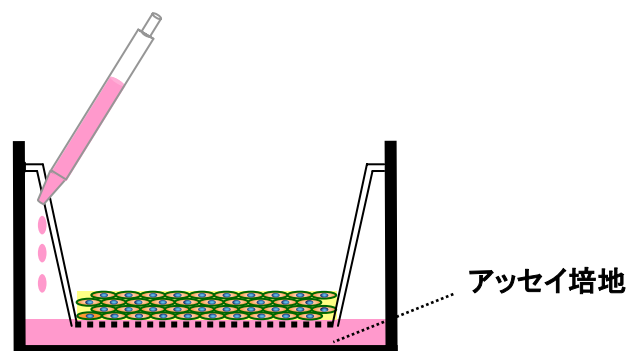
② 培地交換と培養

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

（1） 各ウェルの培養カップ外側の培地を吸引除去してください。

吸引除去

アッセイ培地

[Point]
先端の細いパスツールピペット、またはアスピレーティングピペットを用いると容易に吸引することができます。

（2） 各ウェルの培養カップ外側に温めておいたアッセイ培地を 0.5mL ずつ添加します。

アッセイ培地

（2） 24 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。
（3） 培地交換は、毎日行なってください。
培養期間は、試験目的に応じて設定してください。

[Point]
培地交換は毎日行なってください。ただし、アッセイ培地添加量を 1ml とすることで隔日の培養交換としていただくこともできます。

Ⅳ-3. MTT アッセイ（生細胞数測定）

MTT アッセイ

細胞内に取り込まれた MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]が細胞内にあるミトコンドリアの脱水素酵素によって還元されて生じるフォルマザン色素を、有機溶媒により抽出して 570nm の吸光度を測定することで生細胞率を計測する方法です。

＜試験の準備＞

① 機器

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）
・ウォーターバス
・CO_2 インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）
・96 ウェルマルチプレートリーダー（540～590nm、650nm）

② 試薬・器具

・24 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】
・MTT 試薬【別売品】
・96 ウェル測定プレート【別売品】
・イソプロパノール
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット（滅菌済み）
・マイクロチューブ

＊ MTT 試薬、96 ウェル測定プレートは別売品としてご用意しております。
当社までお問い合わせください。

＜試験方法＞

① 準備

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行うことをお勧めします。

(1) MTT を培地（DMEM など）に溶解して、MTT 培地を調製します（終濃度：0.5mg/mL）。必要に応じて MTT 培地を、0.22μm、または 0.45μm フィルターでろ過滅菌します。MTT 培地は試験直前に用時調製します。溶解後は冷暗所で保

存し、できるだけ早く使用してください(24 時間以内)。ご使用の 1 時間前には37℃のウォーターバスで温めます。

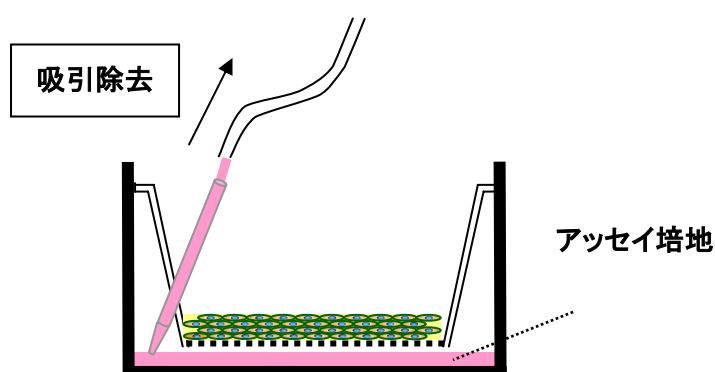
(2) 生細胞数を測定するための LabCyte CORNEA-MODEL を準備します。

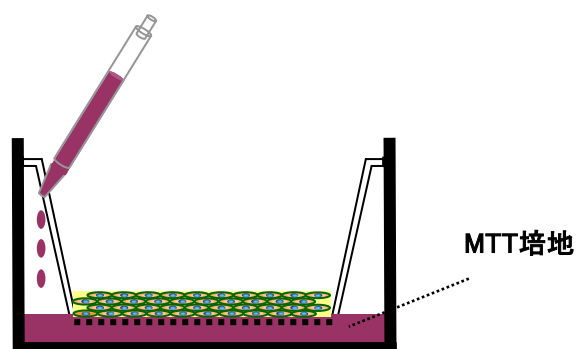
② MTT 反応

操作はすべて、クリーンベンチ(または安全キャビネット)内で無菌的に行うことをお勧めします。

(1) 各ウェルの培養カップの外側のアッセイ培地を吸引除去します。

吸引除去

アッセイ培地

(2) 各ウェルの培養カップの外側に温めた MTT 培地を 0.5mL ずつ分注します。

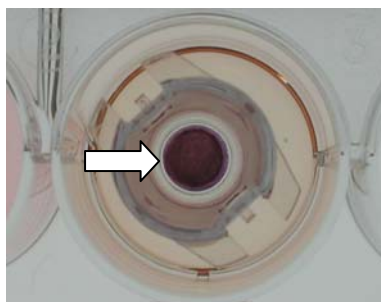
MTT培地

(3) 24 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO2 インキュベーターに入れます。

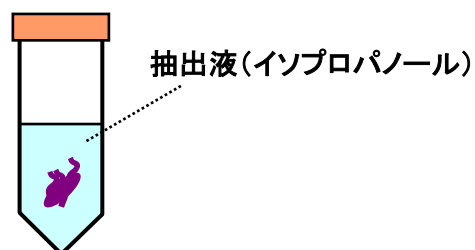
(4) 3 時間静置します。

③ MTT 抽出・吸光度測定

操作はすべて、通常の実験室内でおこなうことができます(無菌操作の必要はありません)。

(1) MTT 反応終了後、24 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り

出します。陰性対照のウェルが紫色に染まっていることを確認してください。

(2)　培養カップ底面の組織メンブランフィルターごとメスで切り取ってください。
(3)　各組織片をマイクロチューブに入れます。
(4)　マイクロチューブにイソプロパノール（通常 200～300μL）を入れ、組織片を完全に浸漬します。

抽出液（イソプロパノール）

(5)　室温・暗所で2時間以上＊静置して色素を抽出します。時々、ボルテックスミキサーなどを用いて振とうすることにより効果的に抽出をおこなうことができます。抽出液の蒸発を避けるため、チューブを完全に密栓してください。
＊金曜日に抽出を開始して、月曜日に抽出液の回収をすることも可能です。
(6)　抽出終了後、マイクロチューブ内の抽出液をピペッティングにより良く混合して96 ウェルプレートの各ウェルに入れます（通常 150～250μL）。
ブランクには、イソプロパノールを用いてください。
(7)　96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、540～590nm（通常 570nm）の吸光度を測定します。650nm の吸光度を差し引くことにより、より正確なデータを得ることができます。
(8)　陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を 100%として、評価物質の生細胞率を算出します。

$$生細胞率(\%) = \frac{評価物質の吸光度 - ブランクの吸光度}{陰性対照の吸光度 - ブランクの吸光度} \times 100$$

Ⅳ-4. WST-8 アッセイ（生細胞数測定）

WST-8 アッセイ

WST-8 は、細胞内にあるミトコンドリアの脱水素酵素によって還元されて水溶性フォルマザン色素になります。 この水溶性フォルマザンは、培地中に拡散するため、培地の吸光度を測定することにより、生細胞率を計測できます。

＜試験の準備＞

③　機器

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）
・ウォーターバス
・37℃に設定可能な振とう機つきインキュベーター
・96 ウェルマルチプレートリーダー（450 nm、650nm）

④　試薬・器具

・24 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】
・Cell Counting Kit (WST-8)【同仁化学　CK04】
・96 ウェル測定プレート【別売品】
・イソプロパノール
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット（滅菌済み）
・マイクロチューブ

＊ 96 ウェル測定プレートは別売品としてご用意しております。
当社までお問い合わせください。

＜試験方法＞

① 準備

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行うことをお勧めします。

（1） WST-8 を PBS, DMEM などに 1:10 の割合で希釈して、WST-8 培地を調製します。WST-8 培地は試験直前に用時調製します。調製した WST-8 培地は、37℃のウォーターバスで温めておきます。
（2） 生細胞数を測定するための LabCyte CORNEA-MODEL を準備します。

② WST-8 反応

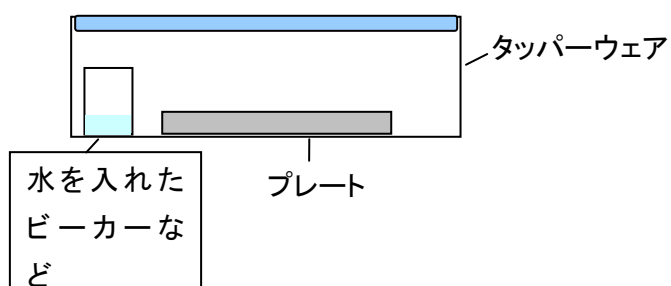
操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行うことをお勧めします。

（1） 各ウェルの培養カップをピンセットなどで取り出し、外側底面をシャーレ等に入れた PBS で 2 度洗浄し、キムタオルなどで培養カップ底面の PBS を良くふき取っておきます。

（2） 新しい 24 ウェルアッセイプレート各ウェルに温めた WST-8 培地を 0.3mL ずつ分注しておき、洗浄した培養カップを設置します。
ブランクとして、WST-8 のみを添加したウェルを準備します。

（3） 培養カップを設置した 24 ウェルアッセイプレートにフタをして、振とう機つきインキュベーターに入れます。

タッパーウェア

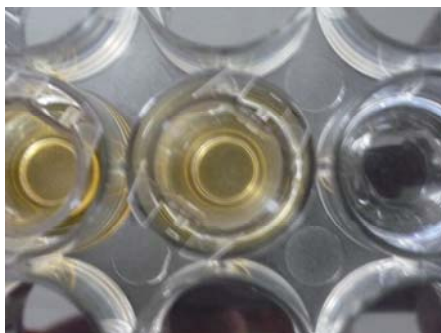
水を入れたビーカーなど

プレート

[Point]
タッパーウェア内に水を張った容器などを入れて、水飽和の状態にします。
フォルマザンの拡散を促進させるため、振とうします。

（4） 5-7 時間 37℃で振とう培養します。

③ 吸光度測定

操作はすべて、通常の実験室内でおこなうことができます（無菌操作の必要はありません）。

（1） WST-8 反応終了後、24 ウェルアッセイプレートを振とう機つきインキュベーターから取り出します。陰性対照の培地がオレンジ色に変化していることを確認してください。

（2） WST-8 倍地をピペッティングにより良く混合して 96 ウェルプレートの各ウェルに入れます（通常 200µL）。

（3） 96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定します。650nm の吸光度を差し引くことにより、より正確なデータを得ることができます。

（4） 陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を 100%として、評価物質の生細胞率を算出します。

$$\text{生細胞率(\%)} = \frac{\text{評価物質の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}}{\text{陰性対照の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}} \times 100$$

Ｖ. ご注意

- 本製品は研究用以外の目的で使用しないでください。
- いかなる場合においても、ヒト・動物への適用や in vitro 診断に用いることは認められていません。
- ウィルス（HIV, HBV, HCV）感染に関する検査は実施しておりますが、ご使用に際しては十分にご注意ください。
- ご使用に際しては、目的の評価物質での予備試験をおこなうことをお勧めいたします。
- 本製品の本来の使い方以外で生じたいかなる事故や損害についても、当社は一切の責任を負いかねますので、ご了承ください。
- 本製品のご入荷後において、以下のような場合には、本製品の返品・交換はいたしかねますので、ご了承ください。
  (1) 不当な取り扱いによる損傷
  (2) 落下等の不注意による損傷
  (3) 火災、地震、水害、落雷、その他の天変地変等の不可抗力による損傷
- 本製品をご使用後は、適切な処理を行なった上で廃棄してください。

J-TEC

【製造・販売元】
株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
〒443-0022　愛知県蒲郡市三谷北通 6-209-1
TEL：0533-66-2020（代表）　FAX：0533-66-2018
E-Mail：jtec-info@jpte.co.jp　　URL：http://www.jpte.co.jp